

Mateja Košutić

**Utjecaj ekstrakta komine masline na aktivnost
 α -amilaze**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Rad je sufinanciran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2014-09-9143).

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na posvećenom vremenu, znanju i stručnim savjetima kojima mi je pomogla da ovaj rad bude cjelovit i smislen te naposljetku uspješno dovršen. Posebno se zahvaljujem asistentici Kristini Radić na vremenu, znanju i velikom strpljenju koje je uložila u pomoć oko provedbe eksperimentalnog dijela ovog rada.

Hvala mojim roditeljima što su mi omogućili školovanje i pružili podršku.

Hvala svim mojim prijateljicama koje su uvijek bile uz mene- i kad smo se žalile i kad smo slavile.

Hvala Tomislavu na bezuvjetnoj podršci, razumjevanju i svim racionalnim savjetima u trenucima kad sam sama bila daleko od toga.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Dijabetes kao jedna od vodećih bolesti današnjice	2
1.1.1 Tip 1 šećerne bolesti (tip 1 DM)	3
1.1.2 Tip 2 šećerne bolesti (tip 2 DM)	4
1.1.3 Komplikacije šećerne bolesti	6
1.1.4 Ciljne vrijednosti metaboličkih parametara u šećernoj bolesti	7
1.1.5 Lijekovi za liječenje šećerne bolesti	7
1.1.6 Akarboza i mehanizam djelovanja	9
1.2 α -amilaza i mehanizam djelovanja	10
1.3 Maslina (<i>Olea europaea</i> , Oleaceae)	11
1.3.1 Prerada ploda masline	11
1.3.2 Polifenoli masline	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1 Materijali	17
3.1.1 Kemikalije	17
3.1.2 Radni materijali i oprema	17
3.1.3 Uzorci komine	17
3.2 Metode	19
3.2.1 Općeniti princip metode i plan istraživanja	19
3.2.2 Priprava reagenasa	20
3.2.3 Izrada kalibracijske krivulje s maltozom	21
3.2.4 Određivanje aktivnosti α -amilaze	22
3.2.5 Određivanje inhibitornog potencijala ekstrakta komine masline na α -amilazu	23
3.2.6 Statistička obrada podataka	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1 Kalibracijska krivulja s maltozom	26
4.2 Aktivnost α -amilaze	27
4.3 Inhibitorni učinak akarboze na α -amilazu	29
4.4 Inhibitorni učinak ekstrakta komine masline na α -amilazu	31

5. ZAKLJUČAK.....	37
6. LITERATURA.....	39
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	42
7.1 Sažetak.....	43
7.2 Summary.....	44
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. Uvod

1.1 Dijabetes kao jedna od vodećih bolesti današnjice

Diabetes mellitus ili šećerna bolest je metabolički poremećaj kompleksne etiologije okarakterizirana stanjem kronične hiperglikemije (glukoza natašte veća od 7.0 mmol/L, glukoza dva sata nakon obroka veća od 11.1 mmol/L) s poremećajem metabolizma ugljikohidrata, masti i proteina, što je rezultat nedostatka izlučivanja inzulina, djelovanja inzulina na razini stanice tj. inzulinske rezistencije ili čak oboje. Kontrola hiperglikemije važna je u liječenju svih tipova ove bolesti jer dugoročno, ako razina glukoze u krvi nije održavana u normalnom rasponu, može doći do ozbiljnih akutnih i kroničnih komplikacija (Rang i sur., 2005; Dastjerdi i sur., 2015).

Prema podacima objavljenim od strane International diabetes federation, 425 milijuna odraslih osoba živi sa šećernom bolešću (www.diabetesatlas.org). Kod čak polovice oboljelih osoba bolest nije dijagnosticirana i ne liječi se. Među gotovo 5 milijuna osoba koje godišnje umru zbog šećerne bolesti, svaka je druga osoba mlađa od 60 godina. Na svjetskoj razini troškovi zdravstvene zaštite vezane uz šećernu bolest iznose preko 670 milijardi dolara (www.hzjz.hr).

Unatoč modernim lijekovima koji se koriste, veliki dio oboljelih i dalje ne postiže zadovoljavajuću regulaciju glikemije, a ni ostalih metaboličkih parametara ključnih u postizanju dobre kontrole bolesti i smanjivanju kroničnih komplikacija. Upravo regulacija glikemije u šećernoj bolesti tipa 2 postaje sve složenija s povećanjem broja dostupnih farmakoloških sredstava. Lijekovi s novim mehanizmima djelovanja važan su napredak, ali njihova učinkovita primjena u svakodnevnoj praksi zahtijeva dobro razumjevanje svih prednosti, kao i mogućih štetnih učinaka (Rahelić i sur., 2016).

Dva su glavna tipa šećerne bolesti:

- ❖ Šećerna bolest tipa 1, prije poznatija kao dijabetes melitus ovisan o inzulinu- IDDM ili šećerna bolest juvenilne dobi.
- ❖ Šećerna bolest tipa 2, prije poznatija kao dijabetes melitus neovisan o inzulinu- NIDDM ili šećerna bolest starije dobi (Rang i sur., 2005).

1.1.1 Tip 1 šećerne bolesti (tip 1 DM)

Ovaj oblik prije se nazivao juvenilni dijabetes ili inzulin-ovisan dijabetes, a prevalencija je različita u raznim dijelovima svijeta. Dijeli se na imunološki posredovan tip dijabetesa i idiopatski dijabetes, a imunološki posredovan oblik je najčešći. Imunološki posredovan tip 1 DM uzrokovan je apsolutnim manjkom inzulina, zbog autoimunog razaranja beta-stanica gušterače (Katzung i sur., 2009).

Pretpostavlja se da nastaje u genetski sklonih osoba izloženim čimbenicima okoliša koji mogu biti okidač za pojavu autoimunog odgovora. Priroda tih čimbenika okoliša nije sasvim poznata, a pretpostavlja se da su to virusi, toksini, ili čak neke sastavnice hrane. Kada je jednom započet proces nastavlja se razaranje beta-stanica i one progresivno propadaju tijekom nekoliko godina. Brzina tog propadanja je promjenjiva, a osobito je brza ako taj proces nastane u djetinjstvu. Nažalost, bolest se otkrije kada je razoreno približno 90% beta-stanica. U djece s tipom 1 DM u vremenu dijagnosticiranja bolesti mogu se u 50-85% slučajeva izmjeriti protutijela na beta-stanice (eng. Islet-cell antibodies, ICA), a neki imaju i inzulinska protutijela. Ta protutijela nisu usmjerena protiv antigena koji potiču autoimuni proces već se protutijela obnavljaju kao odgovor na destrukciju beta-stanica. U odraslih u trenutku otkrića bolesti obično se u serumu ne nalazi mjerljiva koncentracija protutijela vjerojatno jer je u njih autoimuna destrukcija beta-stanica nastupila ranijih godina i stupanj destrukcije je bio toliko spor da je stvaranje protutijela postalo nemjerljivo. No, i u djece i u odraslih u vrijeme dijagnosticiranja mogu se otkriti tzv. anti-GAD protutijela, protutijela na enzim dekarboksilaze glutaminske kiseline, koji je značajan u poticanju autoimune destrukcije beta-stanica.

Vrijeme pojave tipa 1 DM je obično između 10 i 16 godina starosti. Zamijećeno je također češće pojavljivanje u kasnim 30-im i ranim 40-im godinama. Bolesnici su obično mršavi, a uobičajeni simptomi su :

- ❖ prekomjerno mokrenje (poliurija)
- ❖ prekomjerno žeđanje (polidipsija)
- ❖ pojačana glad (polifagija)
- ❖ neobjašnjivo gubljenje tjelesne težine.

Također, koža postaje sklona infekcijama (npr. pruritus vulve, čirevi), mišići slabe i propadaju, javlja se umor, poremećaj vida, tahikardija te hipotenzija (Kujundžić i sur., 2003).

Kod neliječenih stanja mogu se pojaviti ketoni prisutni u izdisaju i mokraći te ketoacidoza u krvi. Dijabetička ketoacidoza je hitno akutno stanje. Nastaje kad nema inzulina zbog ubrzane razgradnje masti do acetil- CoA koji se, u uvjetima kad nema aerobnog metabolizma

ugljikohidrata, konvertira u acetoacetat i β -hidroksibutirat (koji uzrokuju acidozu) i aceton (keton) (Rang i sur., 2005).

Za osobe s DM tipa 1 nadomjesno liječenje inzulinom nužno je za život. Inzulin se razgrađuje u probavnom traktu te se mora primijeniti parenteralno, obično supkutano pomoću ručnih uređaja za injiciranje ili inzulinske pumpe koja potkožno kontinuirano otpušta inzulin. (Katzung i sur., 2009). Humani inzulin proizvodi se rekombinantnom DNA tehnologijom. Različiti pripravci inzulina međusobno se razlikuju po trajanju učinka- npr. preparat srednje dugog djelovanja izofan inzulin često se kombinira s preparatom kratkog djelovanja (npr. topljivi inzulin) primijenjenim prije obroka. Topljivi inzulin se primjenjuje intravenski u slučaju hitnih hiperglikemičnih stanja (ketoacidoza) (Rang i sur., 2005).

1.1.2 Tip 2 šećerne bolesti (tip 2 DM)

Ovaj oblik šećerne bolesti je poznat kao dijabetes koji nastupa u adultnoj dobi ili inzulin-neovisni dijabetes. Tip 2 DM najčešći je oblik dijabetesa i iznosi oko 95% svih dijagnosticiranih slučajeva, a epidemiološka istraživanja pokazuju da je glavni uzrok morbiditeta i rane smrti.

Bolest je heterogena i prema patogenezi i prema kliničkoj manifestaciji (Kujundžić i sur., 2003).

Koncentracija glukoze u plazmi ovisi o ulasku glukoze iz probavnog sustava u krvotok, oslobađanju glukoze iz tjelesnih rezervi, poput glikogena koji je pohranjen u jetri i mišićima procesom glikogenolize te o sintezi glukoze procesom glukoneogeneze u jetri i nekim drugim organima. S druge strane, koncentracija glukoze u plazmi ovisi i o potrošnji glukoze u perifernim tkivima za neposrednu proizvodnju energije u stanici ili za stvaranje spojeva koji služe za pohranu energije. Inzulin je od svih hormona uključenih u regulaciju glikemije najvažniji iako ulogu u fiziološkim uvjetima imaju i glukagon, hormon rasta, kortizol te kateholamini. Osim njih i drugi hormoni poput peptida sličnog glukagonu, melatonina i amilina također sudjeluju u održavanju homeostaze glukoze u plazmi.

Inzulin se luči u portalni krvotok, a svoj učinak prijenosa glukoze iz plazme u unutrašnjost stanice ostvaruje vezanjem na inzulinski receptor u jetri i drugim perifernim tkivima (skeletalni mišići, masne stanice).

Hiperglikemiju u šećernoj bolesti tipa 2 uzrokuju tri osnovna patofiziološka procesa: inzulinska rezistencija s posljedičnim smanjenim utokom glukoze u stanice perifernih tkiva, neprimjereno oslobađanje glukoze iz jetre i oštećena sekretorna funkcija beta-stanica

gušterače. U kompenziranoj fazi poremećaja homeostaze glukoze u organizmu prisutna je hiperinzulinemija. Međutim, kad beta-stanice više ne mogu izlučivati primjerenu količinu inzulina kojom bi se mogla kompenzirati inzulinska rezistencija, nastaje hiperglikemija. U konačnici dolazi do zatajenja beta-stanica pri čemu se smanjuje sinteza, pohrana i sekrecija inzulina (Katzung i sur., 2009; Rahelić i sur., 2016).

Sumarno, tip 2 DM nastaje zbog abnormalnosti kako u izlučivanju, tako i u djelovanju inzulina. Koji defekt nastupa prvi bio je predmet dugotrajnih rasprava dijabetologa, a novija istraživanja sugeriraju da različite populacije mogu startati s različitim primarnim defektom. Neke populacije mogu imati primarni defekt u lučenju inzulina koji uzrokuje hiperglikemiju i inzulinsku rezistenciju, dok druge imaju primarni defekt u inzulinskoj rezistenciji ali ne razvijaju hiperglikemiju sve dok su beta-stanice sposobne lučiti dovoljno inzulina za održavanje normalne koncentracije glukoze. U oba slučaja dovode do porasta stvaranja glukoze u jetri i smanjenja rasprostranjenosti glukoze u tkivima (Kujundžić i sur., 2003).

Oslabljeno djelovanje inzulina djeluje i na metabolizam masti, pa su razine slobodnih masnih kiselina i triglicerida povećane, a recipročno su snižene razine lipoproteina visoke gustoće (HDL) (Rang i sur., 2005).

Osim beta-stanične disfunkcije gušterače važnu ulogu ima i alfa-stanična (α -stanice luče glukagon) i inkretinska disfunkcija. Inkretini su crijevni hormoni koji sudjeluju u fiziološkoj regulaciji homeostaze glukoze. Najviše su proučavani peptid 1 sličan glukagonu (engl. Glucagon like peptide 1, GLP-1) i inzulinotropni hormon ovisan o glukози (engl. Gastric inhibitory peptide, GIP). Oni se izlučuju u prisutnosti hrane u probavnom sustavu, a njihov se učinak ostvaruje vezanjem na receptorska mjesta na alfa i beta stanicama gušterače i stanicama drugih tkiva. Oba hormona imaju kratak poluvijek, brzo ih inaktivira enzim dipeptidil-peptidaza 4 (DPP-4), pa to ograničava njihov učinak na homeostazu glukoze. U osoba sa DM tip 2 njihovo je lučenje ili djelovanje poremećeno.

Bubrezi također imaju važnu ulogu u homeostazi glukoze preko procesa glukoneogenze te iskorištavanjem i reapsorpcijom glukoze pomoću suprijenosnika natrija i glukoze 1 i 2 (engl. sodium-glucose co-transporter, SGLT-1, SGLT-2). Reapsorpcija glukoze proporcionalno se povećava dok se ne premaši bubrežni prag za glukozu koji iznosi oko 10 mmol/L. Pri koncentracijama glukoze u plazmi višim od navedenog praga dolazi do izlučivanja glukoze urinom, odnosno glukozurije. U osoba sa DM tip 2 bubrežni je prag za glukozu povišen, čime se i povećava reapsorpcija glukoze u proksimalnim tubulima bubrega i time pridonosi trajno povišenim koncentracijama glukoze u plazmi. Ova pojava posljedica je

trajno povećane ekspresije SGLT-proteina na membranama bubrežnih tubula koja se javlja u osoba sa DM tipa 2 (Rahelić i sur., 2016).

Tip 2 DM ima strogu genetičku odrednicu, ali razvitak bolesti je pod snažnim utjecajem okoliša, sjedilačkog stila života, manjka tjelovježbe te pretilosti. Za razliku od osoba koje boluju od DM tipa 1, ovi bolesnici često imaju prekomjerenu tjelesnu težinu, obično dugu povijest bolesti sa sporim razvitkom simptoma, mogu čak biti bez simptoma ili imati manje teške ali sporo napredujuće simptome. Glavna razlika od DM tipa 1 je što nema ketonurije, ketoacidoze i protutijela na beta-stanice. Od ostalih simptoma, neki su zajednički tipu 1, kao što su umor, poremećaj vida, polidipsija, poliurija, slabost mišića, sklonost kožnim infekcijama, tahikardija i hipotenzija (Kujundžić i sur., 2003).

1.1.3 Komplikacije šećerne bolesti

Kao posljedica metaboličkih poremećaja u šećernoj bolesti, često se s godinama mogu razviti različite komplikacije. Kasne komplikacije šećerne bolesti uključuju mikrovaskularne i makrovaskularne bolesti.

Mikrovaskularne zahvaćaju:

- ❖ oko (makularni edem) tj. mrežnicu (retinopatija)
- ❖ bubreg (nefropatija)
- ❖ živce (neuropatija).

Pod makrovaskularne spadaju:

- ❖ koronarna arterijska bolest
- ❖ periferna arterijska bolest
- ❖ cerebrovaskularna bolest (Kujundžić i sur., 2003; Rang i sur., 2005).

Procjene pokazuju da više od 50% osoba sa šećernom bolešću umire zbog kardiovaskularnih komplikacija, a u populaciji starijoj od 65 godina to se događa u oko 70% oboljelih (Rahelić i sur., 2016). Od ostalih komplikacija javljaju se ulcerativne i gangrenozne promjene na stopalima s posljedičnim čestim amputacijama dijelova ili čitavih donjih ekstremiteta. Nisu rijetki ni poremećaji autonomnog živčanog sustava koji uključuju poteškoće probavnog i mokraćnog sustava, te seksualne disfunkcije i poremećaje srčanog ritma. Bolesnici mogu razviti i kongestivnu srčanu bolest, iskazanu prisutstvom perifernim edema i kratkim dahom (dispnejom) što je pak posljedica retencije tekućine. Također, ovi bolesnici mogu razviti i sklonost infekcijama, posebice mokraćnog sustava, usne šupljine i genitalnog sustava.

U loše kontroliranom dijabetesu dolazi do porasta glikozilacije mnogih bjelančevina, uključujući hemoglobin i alfa-kristalin u leći oka. Glikozilirani oblik hemoglobina (HbA1c) ima promjenjen afinitet za kisik, i to je vjerojatno čimbenik tkivne anoksije, a glikozilirani alfa-kristalin protein leće dovodi do stvaranja mrežice. Komplex glukozamin-bjelančevina se također stvara u dugotrajnom dijabetesu i stvara biokemijske i morfološke promjene na kapilarama (Kujundžić i sur., 2003).

1.1.4 Ciljne vrijednosti metaboličkih parametara u šećernoj bolesti

Uspješna regulacija glikemije glavni je cilj u liječenju osoba sa šećernom bolesti tipa 2. Rezultati kliničkih ispitivanja nedvojbeno su potvrdili da smanjenje hiperglikemije smanjuje pojavu i progresiju mikrovaskularnih komplikacija. Iako je utjecaj uspješne regulacije glikemije na kardiovaskularne komplikacije i dalje neizvjestan, vjeruje se da određena korist postoji, ali da je ona vjerojatno posljedica dugotrajne poboljšane kontrole. Zajedničke smjernice ADA-e i EASD-a također preporučuju snižavanje HbA1c do 7% u većine oboljelih kako bi se smanjila učestalost mikrovaskularnih komplikacija. To se može postići održavanjem prosječne koncentracije glukoze u plazmi u vrijednostima od približno 8.3 do 8.9 mmol/L, odnosno u idealnim uvjetima ciljna koncentracija glukoze u plazmi natašte i preprandijalno treba biti od 3.9 do 7.2 mmol/L, a postprandijalno do 7.8 mmol/L (Rahelić i sur., 2003).

1.1.5 Lijekovi za liječenje šećerne bolesti

U početku, bolest se liječi dijetom, zajedno s povećanom tjelovježbom. Usprkos tome, oralne hipoglikemijske tvari postaju obvezni dio terapije, a jedna trećina bolesnika mora primati inzulin.

Oralni antidijabetici kojima se provodi liječenje su bigvanidi, sulfonilureje i glinidi, glitazoni, lijekovi s djelovanjem na inkretinski sustav, SGLT2 inhibitori te akarboza (istaknuta u potpoglavlju 1.1.6).

- ❖ U skupinu bigvanida spada metformin. Cjeloukupni mehanizam djelovanja bigvanida i dalje je nerazjašnjen, ali njihov primarni učinak smanjuje proizvodnju glukoze u jetri aktivacijom enzima protein-kinaze koju aktivira AMP (AMPK; engl. AMP-activated protein kinase). Mogući manje važni mehanizmi djelovanja uključuju smanjenje

glukoneogeneze u bubrežima, usporavanje apsorpcije glukoze iz probavnog trakta, izravnu stimulaciju glikolize u tkivima itd. Nastanak hipoglikemije tijekom terapije praktično je nepoznat. Najčešći su štetni učinci na području probavnog trakta (mučnina, povraćanje, abdominalna bol, proljev), a pojavljuju se u oko 20% bolesnika. Ovisni su o dozi te obično prolazni. Uz određena bolesna stanja povećan je rizik od laktacidoze.

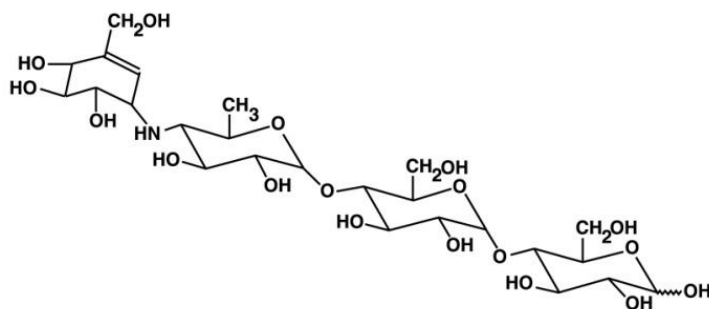
- ❖ Sulfonilureje i glinidi su inzulinski sekretagozi. Glavni učinak je povećano otpuštanje inzulina iz gušterače, a dodatni mehanizam djelovanja je smanjenje razine glukagona u serumu. U ovu skupinu spadaju tolbutamid, tolazamid, glibenklamid, glipizid, repaglinid, nateglinid. Ukratko, pod moguće nuspojave spadaju porast tjelesne težine, hipoglikemija, te gastrointestinalne tegobe. Usprkos tome, često se propisuju i uglavnom dobro podnose.
- ❖ Glitazoni (pioglitazon, rosiglitazon) su ligandi receptora za PPAR γ . Glavno mjesto djelovanja kod dijabetičara je adipozno tkivo, gdje lijek potiče unos i iskorištavanje glukoze. S obzirom na to da njihov mehanizam djelovanja uključuje regulaciju gena, imaju spori početak i prestanak djelovanja koje traje tjednima. Iako su vrlo djelotvorni, eventualni neželjeni štetni učinci, poput porasta tjelesne težine, kongestivnog zatajenja srca, povećanog rizika od prijeloma kostiju u žena ograničuju njihovu popularnosti i širu uporabu.
- ❖ Lijekovi s djelovanjem na inkretinski sustav su GLP-1 agonisti (eksenatid) i DPP-4 inhibitori (sitagliptin). Iako se eksenatid mora primijeniti injekcijom, stekao je popularnost zbog poboljšane kontrole glukoze, povezane s gubitkom tjelesne težine. Sitagliptin ima općenito malo nuspojava, što mu je velika prednost, te također ne uzrokuje porast tjelesne težine (Rang i sur., 2006; Katzung i sur., 2009).
- ❖ SGLT-2 inhibitori su najnovija skupina lijekova, a predstavnik je dapagliflozin. Smanjuju reapsorpciju filtrirane glukoze te smanjuju bubrežni prag za glukozu i na taj način povećavaju izlučivanje glukoze urinom, snižavajući povišene koncentracije glukoze u plazmi. Najčešće prijavljene nuspojave su vulvovaginalna kandidijaza, infekcija mokraćnog sustava i poliurija (Rahelić i sur., 2016).

1.1.6 Akarboza i mehanizam djelovanja

Akarboza je kompetitivni, reverzibilni inhibitor crijevne α -glukozidaze i α -amilaze koja smanjuje porast glukoze u krvi nakon obroka usporavanjem razgradnje i apsorpcije škroba i disaharida u crijevu. Samo se monosaharidi, kao što su glukoza i fruktoza, mogu apsorbirati iz crijevnog lumena u krvotok. Kompleksni ugljikohidrati moraju se prije apsorpcije razgraditi u pojedinačne monosaharide u dvanaesniku i gornjem jejunumu. Tu razgradnju potpomažu crijevni enzimi, α -amilaza iz gušterače i α -glukozidaza koji su vezani za četkastu membranu crijevnih stanica (Katzung i sur., 2009).

Akarboza ima slabiji učinak na α -amilazu. Posljedica inhibicije enzima jest smanjena razgradnja ugljikohidrata u gornjem dijelu crijeva i usporena apsorpcija oralno unesenog škroba i disaharida u donjem dijelu tankog crijeva. Monoterapija umjereno snizuje vrijednosti glikoziliranog hemoglobina (0,5-1%) i glukoze nataše za 1,1-1,4 mmol/L.

Nadimanje, proljev i abdominalna bol najizraženiji su štetni učinci koji nastaju zbog toga što se neprobavljeni ugljikohidrati u crijevu fermentiraju u kratkolančane masne kiseline, otpuštajući pri tom plin. Lijek je kontraindiciran u osoba sa upalnim crijevnim bolestima. Općenito se malokad propisuje zbog značajnih gastrointestinalnih nuspojava (Rang i sur., 2006; Katzung i sur., 2009).

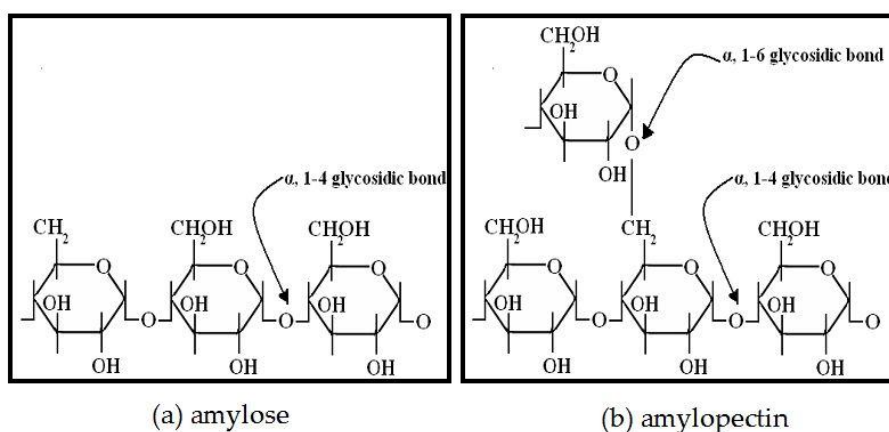


Slika 1. Akarboza, kemijska struktura (preuzeto sa www.dailymed.nlm.nih.gov)

1.2 α -amilaza i mehanizam djelovanja

Škrob (*lat. Amylum*) je visokomolekularni ugljikohidrat, polisaharid s općom formulom $(C_6H_{10}O_5)_n$, izgrađen od međusobno povezanih molekula D-glukoze povezanih α -1,4-glikozidnom vezom. Sastoji se od amiloze i amilopektina (www.britannica.com).

Amiloza se sastoji od nerazgranatih lanaca D-glukoze koje su povezane α -1,4-glikozidnom vezom. Amilopektin se sastoji od razgranatih lanaca D-glukoze, na svakih otprilike trideset α -1,4-glikozidnih veza dolazi po jedna α -1,6-glikozidna veza (Bertoft, 2017).



Slika 2. Struktura amilopektina i amiloze (preuzeto s www.usmle.biochemistryformedics.com)

α -amilaze (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolaze, EC 3.2.1.1) su skupina enzima koja katalizira hidrolizu (α -1,4) glikozidnih veza u škrobu i nekih drugim oligosaharidima (Singla i sur., 2016). Bitno je istaknuti da ne djeluju na (α -1,6) veze na ograncima u amilopektinu. Djelovanjem amilaze na amilozu nastaju sljedeće molekule:

- ❖ linearni α -dekstrin
- ❖ neki oligosaharidi
- ❖ maltoza (koja je disaharid glukoze)
- ❖ maltrioza (koja je trisaharid glukoze)
- ❖ glukoza.

Djelovanjem na amilopektin nastaju veći, razgranati α -dekstrini (zbog nerazgrađenih α -1,6 veza), također neki oligosaharidi, maltoza i glukoza (www.sciencedirect.com).

1.3 Maslina (*Olea europaea*, *Oleaceae*)

Maslina je dugovječno, vazdazeleno, 8-12 m visoko drvo, vrlo kvrgavo i nepravilno povijeno s mnoštvom grana. Listovi su duguljasti, kožasti, s gornje strane tamnozeleni, a s donje srebrenasti. Bijeli su cvjetovi u uspravnim grozdovima. Plod je zelena, ovalna koštunica, dužine 2-3 cm, koja mijenja boju od zelene, crvenkaste, do tamnomodre, gotovo crne. Pitoma se maslina uzgaja u većoj ili manjoj mjeri duž cijelog obalnog područja, a sporadično i drugdje, ako to klimatski uvjeti dopuštaju. Kao uzgajana kultura poznata je u oko 1000 varijeteta, čije morfološke i anatomske osobine ovise o sastavu tla i klimi. Naziv olea izvodi se od „elaia“ imena za stablo masline u starih Grka. Maslinovo se ulje nazivalo „elaion“. Rimski je naziv „olea“ i „oleum“, a plod su nazivali „oliva“. I starci Grci i Rimljani veoma su cijenili maslinovo ulje, te njime mazali i tijelo. Danas se u svijetu prednost daje onim vrstama koje su prikladne za dobivanje ulja i za konzerviranje jela (Kuštrak, 2005).

1.3.1 Prerada ploda masline

Plod masline sastoji se od kože, pulpe i sjemenke. Kemijski sastav ploda ovisi o sorti i uvjetima uzgoja, pa stoga postoje razlike u udjelu ulja u plodovima. Ulje se u plodu nalazi u pulpi i to u vakuolama unutar stanica. Kad se plodovi dopreme uljaru, nakon čišćenja i pranja slijedi mljevenje s ciljem oslobađanja ulja iz vakuola u stanicama pulpe ploda. Poželjno je da kapljice ulja, koje se oslobađaju budu što veće jer se tako ulje lakše ekstrahira. Da bi se manje kapljice ujedinile u veće, provodi se miješanje maslinovog tijesta dobivenog mljevenjem. Nakon miješanja slijedi ekstrakcija ulja, koja se temelji na jednom od tri principa: prešanju, centrifugiranju ili selektivnoj filtraciji.

- ❖ Prešanjem se iz maslinovog tijesta izdvaja tzv. „uljni mošt“, tj. mješavina ulja i vode, iz kojeg se ulje odvaja pomoću različitih filtara.
- ❖ Centrifugiranje je proces odvajanja ulja iz maslinovog tijesta na bazi razlike u gustoći ulja, vegetabilne (biljne) vode i krutih čestica. Odvija se u horizontalnim centrifugama ili dekanterima, s dva ili tri izlaza. Ako postoje dva izlaza, voda i čvrste čestice se odvajaju zajedno, ulje zasebno, a ako su tri izlaza, sve tri komponente se odvajaju posebno: ulje, voda i čvrsta tvar.
- ❖ Izdvajanje ulja selektivnom filtracijom moguće je zbog različite površinske napetosti ulja i vode. Aparat je sastavljen od mnogo tankih pločica od nehrđajućeg čelika koje

se uranjanju u maslinovo tijesto i kad se izvuku van, na sebi zadržavaju ulje zbog njegove manje površinske napetosti (Savić i sur., 2009).

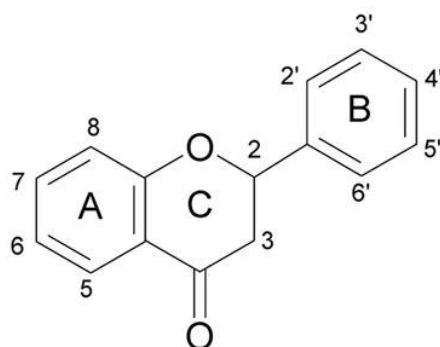
Preradom maslina u ulje dobiva se i velika količina „otpada“ i to u obliku komine masline (čvrsti otpad) i vegetabilne vode (tekuća faza). Procesom centrifugiranja dobiva se i treća vrsta- mješavina komine i vegetabilne vode. U EU procjena količine otpada koji nastaje proizvodnjom maslinovog ulja iznosi 6,8 milijuna tona godišnje (Taralas i Kontominas, 2006). U Hrvatskoj se proizvodi oko 30 000 tona maslina godišnje, pri čemu nastaje oko 12000 tona svježe komine.

Komina je čvrsti nusprodukt dobiven preradom maslinovog ulja, a sastoji se od kože ploda, pulpe i dijelova koštice. Glavni kemijski sastojci su celuloza, proteini, voda, ulje i polifenoli. Udio vode u komini varira ovisno o procesu prerade maslina. Udio proteina uglavnom je nizak, a aminokiselinski sastav sličan je onome kod zrna ječma. Najviše može varirati udio ulja jer je najvisniji o sorti, uvjetima uzgoja, klimatskim uvjetima itd. (Savić i sur., 2009).

1.3.2 Polifenoli masline

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti, kemijske strukture koja sadrži jedan ili više aromatskih prstenova, sa jednim ili više hidroksilnih supstituenata.

Maslina, tj. njen list i plod sadrže polifenole koji se dijele na flavonoide, lignane i glikozide. Nađeni su i u uljnoj i vodenoj fazi, a uključuju fenolne alkohole hidroksitirozol (3,4-dihydroxyphenylethanol, 3,4-DHPEA) i tirozol (*p*-hydroxyphenylethanol, *p*-HPEA) i njihove sekoiridoidne prekursore. Tu spadaju oleuropein, oleacein i oleocanthal. Također, polifenoli masline su i verbaskozid, lignani pinorezinol, 1-acetoksipinorezinol i neki drugi sekoiridoidi (Rigacci i Stefani, 2016).



Slika 3. Općenita struktura polifenolnih spojeva (preuzeto i prilagođeno od Acquaviv i Lauk, 2010.)

Smatra se da su upravo ovi spojevi nositelji određenih ljekovitih svojstava masline, kao što su anti-aterogeno, anti-hepatotoksično, protuupalno, protutumorsko, anti-dijabetičko, antiviralno i imunomodulacijsko (Fabiani i sur., 2008; Tundis i sur., 2008). Glavno svojstvo na kojem se ovi učinci temelje je izuzetan antioksidativni potencijal polifenolnih spojeva, koji se ostvaruje modulacijom oksidativnih puteva, direktnim djelovanjem na enzime, proteine i receptore, a također i preko epigenetičke modifikacije kromatina.

Zbog navedenog, sve je više istraživanja i studija koje se bave proučavanjem mediteranske prehrane, te taj način prehrane povezuju s usporenim starenjem i smanjenom incidencijom bolesti koje se povezuju sa starijom životnom dobi, kao što su kardiovaskularne bolesti, karcinomi, Alzheimerova bolest itd. Piramida pravilne prehrane neprestano se revidira i sve više se naglašava unos svježeg voća, povrća, leguminoza, orašastih plodova i kvalitetnih ulja kao što je npr. maslinovo. Posebno se preporuča visok unos tzv. fitonutrijenata (vitamini i polifenoli), za koje je utvrđeno da imaju učinak na popravak DNA, regulaciju metabolizma, te regulaciju mnogih signalnih puteva koji utječu na homeostazu u cijelom organizmu (Rigacci i Stefani, 2016).

2. Obrazloženje teme

Broj oboljelih od dijabetesa svake godine rapidno se povećava. Mnogo je dostupnih lijekova i načina liječenja, a usprkos tome, velik broj ljudi i dalje umire zbog posljedica nekontrolirane bolesti. Također, većina bolesnika živi smanjenom kvalitetom života, bilo zbog loše kontrole bolesti, bilo zbog nuspojava lijekova tj. neprilagođene terapije. Jedan od načina za snižavanje postprandijalne hiperglikemije je smanjenje ili usporavanje probave ugljikohidrata unesenih hranom. Inhibicija enzima uključenih u taj proces, npr. α -amilaze, mogla bi poslužiti u terapijske svrhe. Inhibicija α -amilaze u određenoj mjeri se postiže akarbozom, kako je navedeno u prethodnom poglavlju. Međutim, zbog izraženih gastrointestinalnih nuspojava, lijek se ne propisuje često i mnogi pacijenti odustaju od njega.

Navedeno je potaklo mnoga istraživanja na ljekovitom biljkama i aktivnim komponentama izoliranim iz njih, koji bi mogli poslužiti kao novi antidijabetici, neki od njih i kao novi inhibitori α -amilaze. Cilj je postići dobru kontrolu postprandijalne glikemije, bez štetnih učinaka na probavni sustav, što bi bilo moguće upravo ljekovitim biljem. Primjena bioaktivnih komponenata iz hrane i bilja sa antidijabetičkim učinkom bila bi osobito korisna kao sastavni dio dijetoterapije pacijenata sa preddijabetesom.

Kako je plod masline bogat izvor fenolnih spojeva sa dokazanim različitim učincima na zdravlje, cilj ovog rada je ispitati i utvrditi mogući inhibitorski učinak ekstrakta komine masline na enzim α -amilazu.

U svrhu istraživanja mogućnosti dodatnog poboljšanja učinkovitosti ekstrakta komine, uz nativni ekstrakt komine pripremljeni su i istraženi ekstrakti inkapsulirani ciklodekstrinima, hidroksi propil β ciklodekstrinom (HPB) i nasumično metiliranim β ciklodekstrinom (RAMEB).

3. Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

- ❖ Natrij fosfat, monobasic dihidrat, Kemika 1406707
- ❖ Natrij klorid, T.T.T. 7647-14-5
- ❖ Škrob (iz krumpira), Sigma S-9765
- ❖ Natrij hidroksid, Carlo Erba 480507
- ❖ Natrij kalij tartarat, tetrahidrat, Sigma-Aldrich 25508
- ❖ 3,5-dinitrosalicilna kiselina, Product Number D0550
- ❖ D-(+)-maltoza, monohidrat, Riedel-deHaën 15718
- ❖ Akarboza, Sigma-Aldrich PHR-1253
- ❖ α -amilaza iz svinjske gušterače, Type VI-B, Sigma A3176
- ❖ Uzorci komine masline (vidi odjeljak 3.1.3)
- ❖ Destilirana voda
- ❖ Klorovodična kiselina, Kemika 1324301

3.1.2 Radni materijali i oprema

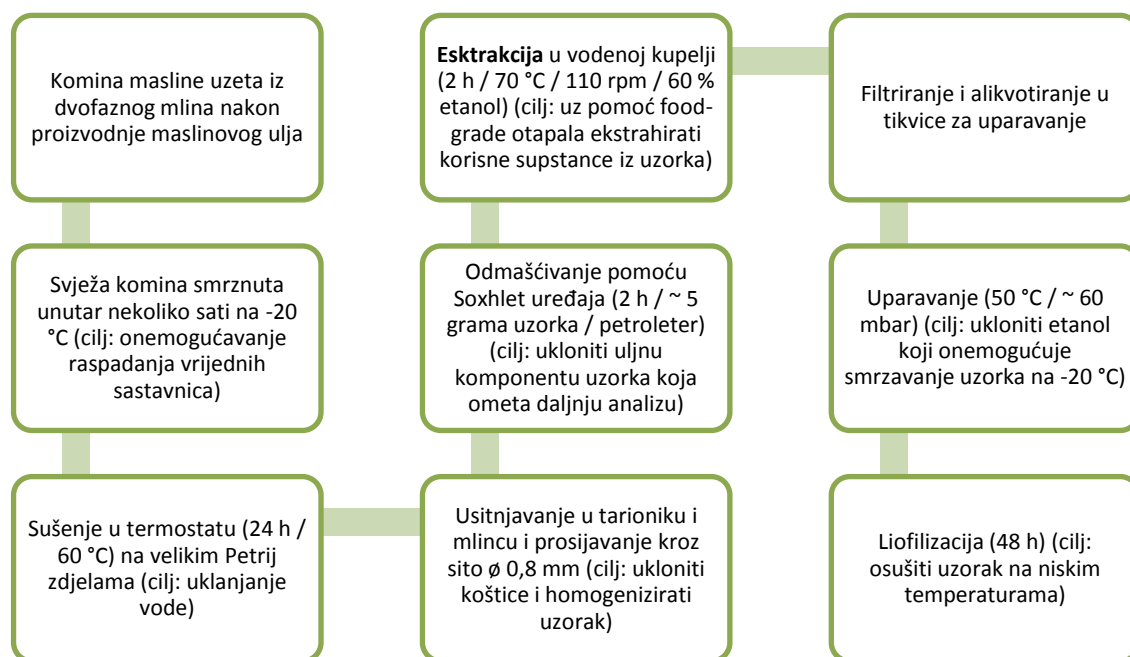
- ❖ UV-VIS spektrometar UV 4-100, ATI Unicam, Cambridge, Velika Britanija
- ❖ Vortex miješalica, tip VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan
- ❖ Termostatirana kupelj s mućalicom, tip 1086, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Njemačka
- ❖ Analitička vaga, Metler Toledo AB265S
- ❖ Plamenik, Poligas OMM, Padova, Italija

3.1.3 Uzorci komine

Komina masline prikupljena je tokom 2017.godine, a mješavina je komina iz više uljara Republike Hrvatske. U svrhu dodatnog poboljšanja učinkovitosti ekstrakta, pripremljeni su i uzorci inkapsulirani ciklodekstrinima HPB i RAMEB.

Priprema ispitivanih uzoraka započela je tako da je komina masline uzeta iz dvofaznog mlina nakon proizvodnje maslinovog ulja. Zatim je svježa komina smrznuta unutar nekoliko sati na -20°C . Uslijedilo je sušenje u termostatu na velikim Petrij zdjelama, usitnjavanje u tarioniku i

mlincu i prosijavanje kroz sito 0,8 mm. Zatim se uzorak odmašćivao pomoću soxlet uređaja (2h/5 grama uzorka/petroleter), te ekstrahirao u vodenoj kupelji (2h/70°C/110 rpm/60% etanol). Uslijedilo je filtriranje i alikvotiranje u tikvice za uparavanje, uparavanje (50°C/ 60 mbar) te naposljetku liofilizacija 48h.



Slika 4. Shematski prikaz pripreme uzorka

Ekstrakcija je provedena uzorcima navedenim u tablici 1. Također su navedene masene koncentracije dobivenih suhih ekstrakata.

Tablica 1. Korišteni uzorci komine masline i masene koncentracije

Oznaka uzorka	Vrsta ciklodekstrina	Masena koncentracija komine (g/L)	Masena koncentracija ciklodekstrina (g/L)	Masena koncentracija suhog ekstrakta (g/L)
NATIVNI	-	20	0	50
HPB	Hidroksi propil β	20	8	90
RAMEB	Nasumično metilirani β	20	8	90

Za ovaj proces, korištena je sljedeća oprema i kemikalije:

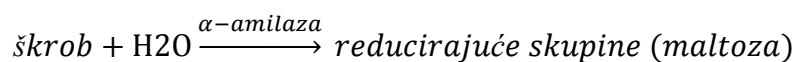
- ❖ Termostat (INKO) (*sušenje*)
- ❖ Soxhlet aparatura (INKO SK6ESS) + Petroleum ether (CARLO ERBA REAGENTS V7L559307L) (*odmašćivanje*)
- ❖ Metalna sita (Prüfsieb DIN 4188) (*prosijavanje*)
- ❖ liofilizator (Christ Alpha 1-4 LOC-1) + mast za pomašćivanje (Vacuum grease, Sigma Aldrich 18405) (*liofilizacija*)
- ❖ vakuum pumpa (Leybold Trivac D 2,5 E) + ulje za pumpu (Leybonol LVO 100) (*liofilizacija*)
- ❖ Büchi Vacuum controller V-800 (*uparavanje*)
- ❖ Büchi Heating bath B-490 (*uparavanje*)
- ❖ Vakuum pumpa (Büchi Vac V-500) (*uparavanje*)

3.2 Metode

3.2.1 Općeniti princip metode i plan istraživanja

Metoda korištena za izvedbu mjerenja u ovom radu je „Enzymatic Assay of α -Amylase (EC 3.2.1.1)“, Sigma-Aldrich, preuzeta sa <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.printerview.html>. Navedena metoda prilagođena je i doradena.

Korištena metoda temelji se na sljedećoj kemijskoj reakciji.



Razgradnjom škroba djelovanjem enzima α -amilaze nastaje disaharid maltoza. Nakon provedene reakcije, u reakcijsku smjesu dodaje se reagens za razvijanje boje, koji s nastalim produktom daje žuto-narančasto obojenje.

Na temelju ove reakcije, količinu nastalih reducirajućih šećera moguće je izmjeriti spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 540 nm.

Kalibracijska krivulja izrađena je korištenjem maltoze (provode se reakcije sa otopinama maltoze poznatih koncentracija).

Za određivanje aktivnosti α -amilaze pripravljene su otopine enzima u različitim koncentracijama te je reakcija provedena sa svakom od njih. Nakon toga je izmjerena apsorbanacija svake reakcijske smjese. Korištenjem kalibracijske krivulje dobivena je masa oslobođene maltoze u svakoj reakcijskoj smjesi te je izrađen grafički prikaz ovisnosti mase oslobođene maltoze o koncentraciji enzima.

U trećem dijelu istraživanja ispitan je inhibitorski potencijal ekstrakata komine masline na α -amilazu te uspoređen sa akarbozom kao standardnim inhibitorom. U tu svrhu pripravljene su otopine uzoraka komine u različitim koncentracijama i inkubirane s enzimom. Iz izmjerenih apsorbanacija izračunata je aktivnost enzima, te dobivena ovisnost aktivnosti enzima o koncentraciji potencijalnog inhibitora.

3.2.2 Priprava reagenasa

- ❖ Pufer (26 mM natrij fosfat monobasic dihidrat i 6.7 mM natrij klorid, pH 6.9, na temperaturi 20°C)- pripremljena je otopina od 3.1 mg/mL natrij fosfata monobasic dihidrata i 0.39 mg/mL natrij klorida u destiliranoj vodi. Prilagođeno je na pH 6.9 dodatkom 1 M NaOH/ 1 M HCl.
- ❖ Otopina škroba 1.0% (w/v)- pripravljena je otopina koncentracije 10 mg/mL otapanjem škroba iz krumpira u puferu. Otapanje je postignuto tako da se smjesa kuhala 15 min nakon postignutog vrenja uz mješanje. Zatim je sklonjena sa plamena, te je mješanje nastavljeno do ohlađenja na sobnu temperaturu. Na kraju je nadopunjena do konačnog volumena destiliranom vodom.
- ❖ NaOH 2 M otopina - pripravljena je otopina koncentracije 80 mg/mL otapanjem natrijeva hidroksida u destiliranoj vodi.
- ❖ Natrij kalij tartarat, tetrahidrat, 5.3 M otopina- pripravljena je otopina koncentracije 1.496 mg/mL natrij kalij tartarata tetrahidrata u 2 M otopini NaOH. Otopljeno je grijanjem na plameniku uz mješanje (nije zagrijano do vrenja).

- ❖ 3,5-Dinitrosalicilna kiselina, 96 mM otopina- pripravljena je otopina koncentracije 21.9 mg/mL 3,5-dinitrosalicilne kiseline u destiliranoj vodi. Otopljeno je grijanjem na plameniku uz mješanje (nije zagrijano do vrenja).
- ❖ Reagens za razvijanje boje, otopina- za pripravu 40 mL, uporabljeno je:
 - 12.0 mL destilirane vode, tople, 50-70°C. Uz mješanje, polako je dodano:
 - 8 mL toplog natrij kalij tartarata tetrahidrata, 5.3 M
 - 20 mL tople otopine 3,5-dinitrosalicilne kiseline, 96 mM
 (Reagens za razvijanje boje, otopina je stabilna na sobnoj temperaturi i zaštićena od svjetla 6 mjeseci. Navedeni volumen može se prilagoditi prema potrebnoj količini).
- ❖ 0.5% (w/v) standard maltoze- pripravljena je otopina koncentracije 5 mg/mL otapanjem D-(+) maltoze, monohidrata u destiliranoj vodi.
- ❖ Otopina α -amilaze- neposredno prije uporabe, pripravljena je otopina α -amilaze u destiliranoj vodi. Koncentracija stock otopine u drugom dijelu istraživanja (određivanje aktivnosti enzima) je 0.0625 mg/mL, a u trećem (određivanje inhibitornog potencijala) 0.0750 mg/mL.
- ❖ Akarboza- pripravljena je stock otopina koncentracije 0.08 mg/mL u destiliranoj vodi.
- ❖ Uzorci komine masline- pripravljena je stock otopina koncentracije 12.5 mg/mL nativnog uzorka i stock otopina koncentracije 25 mg/mL uzoraka inkapsuliranih ciklodekstrinima otapanjem u destiliranoj vodi.

3.2.3 Izrada kalibracijske krivulje s maltozom

U kivete označene brojevima dodani su sljedeći reagensi: 0.5% standardna otopina maltoze, destilirana voda i reagens za razvijanje boje. Standardna otopina maltoze i destilirana voda dodani su u različitim volumenima, da bi konačno dobili koncentracijski niz otopine maltoze sa dvostrukim razrjeđenjima. Priređeno je ukupno 5 takvih otopina (STD1-STD5), te slijepa proba koja sadrži samo destiliranu vodu (bez maltoze) (STD BLK).

Kivete su zatvorene i stavljene na inkubaciju u kupelj s mješalicom (90°C) na točno 15 minuta te je nakon hlađenja u njih još dodano 9 mL destilirane vode. Nakon toga, apsorbancija se mjeri na 540 nm.

Tablica 2. Reagensi korišteni za izradu kalibracijske krivulje s maltozom (navedeni po redu dodavanja u reakcijske smjese STD1-STD4 i STD BLK)

Reagens	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD BLK
0.5% (w/v) standard maltoze/ mL	0.500	0.250	0.125	0.063	0.031	—
Destilirana voda/ mL	2.500	2.750	2.875	2.938	2.969	3.000
Reagens za razvijanje boje/ mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Destilirana voda/ mL	9.000	9.000	9.000	9.000	9.000	9.000

Iz koncentracije otopina maltoze i pripadajućeg volumena (4 mL) izračunata je masa maltoze.

Izmjerene apsorbancije korigirane su slijepom probom (ΔA) te je grafički prikazana ovisnost apsorbancije o masi maltoze u reakcijskoj smjesi (kalibracijska krivulja).

3.2.4 Određivanje aktivnosti α -amilaze

Priređeno je 5 otopina različitih koncentracija (dvostruka razrjeđenja) α -amilaze, i slijepa proba (blank) koja umjesto enzima sadrži jednaki volumen pufera.

U kivete označene brojevima 1-5 prvo je ispipetirana otopina škroba u volumenu od 1 mL. Reakcijske smjese su izmješane na vortex mješalici na sobnoj temperaturi. Zatim je dodana α -amilaza (stock otopina koncentracije 0.0625 mg/mL) u volumenima navedenim u tablici.

Otopine enzima sa škrobom izmješane su na vorteks mješalici te inkubirane točno 3 min na sobnoj temperaturi. Zatim je u reakcijske smjese dodan reagens za razvijanje boje.

Reakcijske smjese su izvorteksirane te inkubirane 15 min na kupelji s mješalicom (90°C). Nakon toga, u reakcijske smjese je ponovno dodana α -amilaza; smjese su ohlađene na ledu do sobne temperature i u njih je dodano 9 mL destilirane vode.

Tablica 3. Reagensi korišteni za određivanje aktivnosti α -amilaze (navedeni po redu dodavanja u reakcijske smjese 1-5 i blank)

Reagens	1	2	3	4	5	blank
Otopina škroba/ mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
α -amilaza/ mL	1.000	0.500	0.250	0.125	0.063	1.000 mL pufera umjesto enzima
Reagens za razvijanje boje/ mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
α -amilaza (2.dodavanje)/ mL	1.000	1.500	1.750	1.875	1.937	1.000 mL pufera umjesto enzima
Destilirana voda/ mL	9.000	9.000	9.000	9.000	9.000	9.000

Reakcijske smjese su izvorteksirane, i izmjerena je apsorbancija na 540 nm. Sve analize provedene su u triplicatu. Izmjerene apsorbancije reakcijskih smjesa korigirane su slijepom probom te je na temelju dobivenih vrijednosti korištenjem kalibracijske krivulje izračunata masa maltoze oslobođena djelovanjem enzima.

Izrađen je grafički prikaz ovisnosti mase oslobođene maltoze o koncentraciji α -amilaze.

3.2.5 Određivanje inhibitornog potencijala ekstrakta komine masline na α -amilazu

Inhibicija enzima α -amilaze ispitana je sljedećim uzorcima (u zagradama su navedene početne koncentracije uzoraka):

- ❖ akarboza- pozitivna kontrola (0.08 mg/mL)
- ❖ nativni ekstrakt komine masline (12.5 mg/mL)
- ❖ ekstrakt komine masline inkapsuliran HPB-om (25 mg/mL)
- ❖ ekstrakt komine masline inkapsuliran RAMEB-om (25 mg/mL)

Za svaki uzorak priređene su 4 otopine (označene brojevima 1-4) različitih koncentracija (dvostruka razrjeđenja) i blank uzorak koji ne sadrži potencijalni inhibitor. Prvi korak postupka uključuje inkubaciju tih uzoraka sa α -amilazom 3 minute na sobnoj temperaturi. Nakon toga, postupak je proveden prema opisu iz poglavlja 3.2.4. Korištena je α -amilaza koncentracije 0,075 mg/mL. Reakcijske smjese izrađene su prema vrijednostima navedenim u tablici 4.

Tablica 4. Reagensi korišteni za određivanje inhibitornog potencijala uzoraka komine masline na enzim α -amilazu (navedeni po redu dodavanja u reakcijske smjese 1-4 i blank)

Reagens	1	2	3	4	blank
Uzorak / mL	1.000	0.500	0.250	0.125	-
Pufer/ mL	-	0.500	0.750	0.875	1.000
α -amilaza/ mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Otopina škroba/ mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Reagens za razvijanje boje/ mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Destilirana voda/ mL	9.000	9.000	9.000	9.000	9.000

Za svaku analizirani uzorak pripremljene su i slijepe probe na način da je otopina škroba dodana nakon reagensa za razvijanje boje. Vrijednosti apsorbancije uzoraka korigirane su pripadajućim slijepim probama.

Postotak aktivnosti α -amilaze izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aktivnost } \alpha \text{ amilaze}(\%) = \frac{\Delta A_{540} \text{ (uzorak)}}{\Delta A_{540} \text{ (blank)}} \times 100$$

ΔA_{540} (uzorak)- $A_{540\text{nm}}$ uzorka korigirana sa $A_{540\text{nm}}$ slijepe probe uzorka; ΔA_{540} (blank)- $A_{540\text{nm}}$ blank uzorka korigirana sa $A_{540\text{nm}}$ slijepe probe blank

Napravljena je regresijska krivulja, koja pokazuje ovisnost aktivnosti enzima (%) o koncentraciji njenog potencijalnog inhibitora (mg/mL). Korištenjem dobivenog nagibnog pravca izračunata je minimalna inhibitorna koncentracija (IC_{50}) za svaki analizirani uzorak i akarbozu. IC_{50} vrijednost je koncentracija (mg/mL) inhibitora potrebna da se aktivnost enzima smanji za 50% (Bachmann, 2009).

3.2.6 Statistička obrada podataka

Za statističku analizu dobivenih podataka i izradu grafičkih prikaza korišteni su Microsoft Office Excel i GraphPad Prism programi. Sva mjerenja provedena su u triplicatu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti uz pripadajuću standardnu devijaciju i relativnu standardnu devijaciju. Dobiveni rezultati međusobno su uspoređeni korištenjem jednosmjerne analize varijance uz korištenje Tukey *post hoc* testa po potrebi. Statistički značajna razlika utvrđena je za vrijednost $p < 0.05$.

4. Rezultati i rasprava

4.1 Kalibracijska krivulja s maltozom

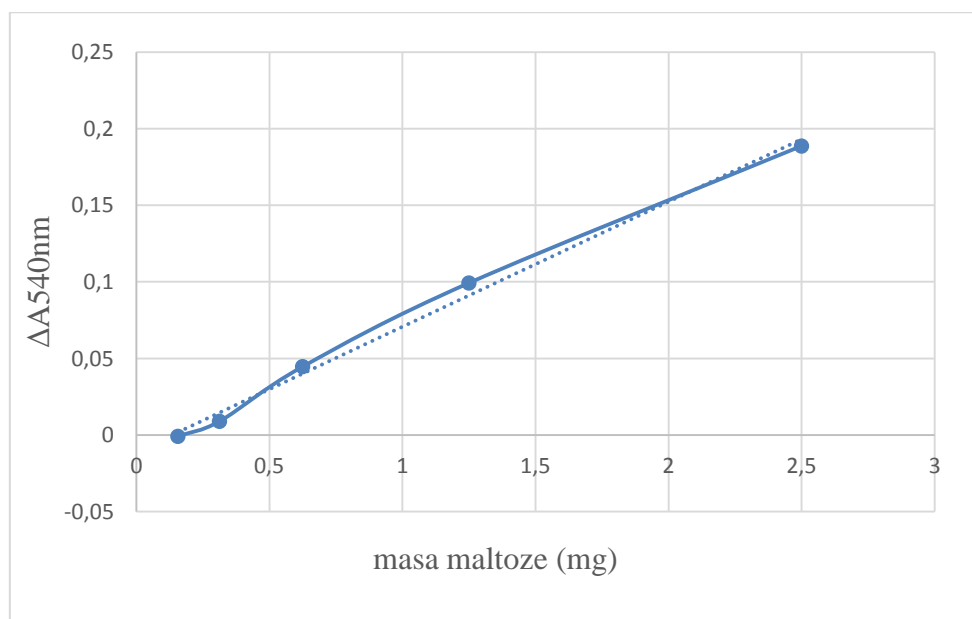
Za otopine maltoze koncentracija navedenih u tablici 5. izmjerene su apsorbancije na valnoj duljini od 540 nm. Prema postupku navedenom u poglavlju metode, 3.2.3, izračunata je masa maltoze u svakoj od otopina, te $\Delta A_{540\text{nm}}$.

Tablica 5. Koncentracijski niz otopina maltoze i izmjerene pripadajuće apsorbancije reakcijskih smjesa

γ (mg/mL)	m (mg)	$A_{540\text{ nm}}$	$\Delta A_{540\text{ nm}}$
0.62500	2.50000	0.21590	0.18870
0.31250	1.25000	0.12650	0.09930
0.15625	0.62500	0.07190	0.04470
0.07813	0.31250	0.03620	0.00900
0.03906	0.15625	0.02640	-0.00080
blank	-	0.02720	-

γ – koncentracija otopine maltoze; m - masa maltoze; $A_{540\text{nm}}$ - izmjerena apsorbancija; $\Delta A_{540\text{ nm}}$ - izmjerena apsorbancija korigirana s blank

Na temelju dobivenih i izračunatih rezultata, $\Delta A_{540\text{nm}}$ i mase maltoze, dobiven je sljedeći grafički prikaz.



Slika 5. Ovisnost $\Delta A_{540\text{nm}}$ o masi maltoze u reakcijskoj smjesi

$\Delta A_{540\text{ nm}}$ - izmjerena apsorbancija korigirana s blank

Dobivene točke daju pravac jednadžbe $y = 0.0815x - 0.0108$, sa R^2 vrijednošću 0.994. Na temelju dobivenog grafa uočavamo linearnu ovisnost apsorbancije o masi maltoze.

4.2 Aktivnosti α -amilaze

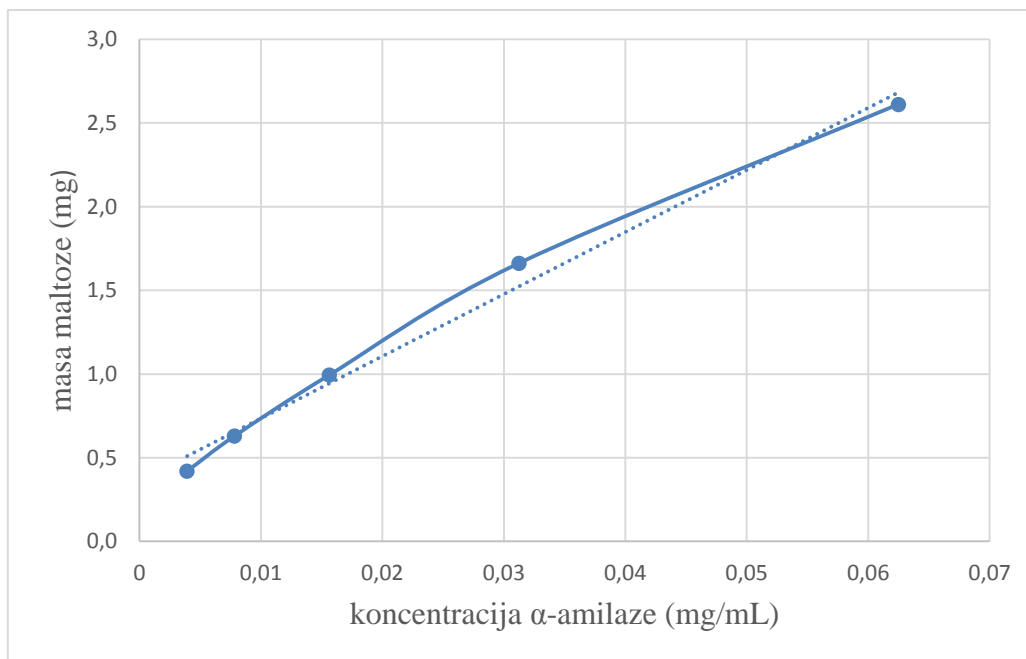
Za određivanje aktivnosti enzima priređen je koncentracijski niz α -amilaze u rasponu 0.0625 mg/mL do 0.003906 mg/mL, kako je prikazano u tablici 6. Izmjerene su apsorbancije, koje su zatim korigirane s blank (slijepom probom). Pomoću kalibracijske krivulje u poglavlju 4.1 određena je masa maltoze koja se oslobodila djelovanjem enzima.

Tablica 6. Koncentracijski niz otopine α -amilaze s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancije i mase maltoze

γ (mg/mL)	$A_{540\text{ nm}}$ 1	$A_{540\text{ nm}}$ 2	$A_{540\text{ nm}}$ 3	avg	stdev	RSD	$\Delta A_{540\text{ nm}}$	m maltoze/mg
0.06250	0.2267	0.2273	0.2274	0.2271	0.0004	0.2	0.2019	2.6
0.03125	0.1489	0.1502	0.1504	0.1498	0.0008	0.5	0.1246	1.7
0.01563	0.0917	0.0948	0.0998	0.0954	0.0041	4.3	0.0702	1.0
0.00781	0.0655	0.0657	0.0660	0.0657	0.0003	0.4	0.0405	0.6
0.00391	0.0484	0.0488	0.0487	0.0486	0.0002	0.4	0.0234	0.4
blank	0.0252	0.0252	0.0252	0.0252	0.0000	0.0	-	-

γ - koncentracija α -amilaze; $A_{540\text{ nm}}$ 1-3- izmjerena apsorbancija; avg- srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija; stdev- standardna devijacija; RSD- relativna standardna devijacija; $\Delta A_{540\text{ nm}}$ - izmjerena apsorbancija korigirana s blank; m maltoze- masa maltoze

Na temelju dobivenih i izračunatih rezultata - koncentracijskog niza α -amilaze, izmjerenih pripadajućih apsorbancija i izračunate mase oslobođene maltoze, dobiven je sljedeći grafički prikaz.



Slika 6. Ovisnost mase oslobođene maltoze u otopini o koncentraciji enzima α -amilaze

Dobivene točke daju pravac jednadžbe $y = 37.083x + 0.3651$, sa R^2 vrijednošću 0.9888.

Iz dobivenog grafičkog prikaza uočavamo linearnu ovisnost mase maltoze nastale razgradnjom škrob o koncentraciji α -amilaze. Što je enzim prisutan u većoj koncentraciji, izmjerena apsorbancija je bila veća, tj. više se maltoze oslobađalo. Za svaku koncentraciju enzima, svi ostali uvjeti, reagensi i njihove količine bili su jednaki, što je vidljivo u poglavlju metode, 3.2.4. Na temelju navedenog, zaključujemo da aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi sa škrobom ovisi o njegovoj koncentraciji.

4.3 Inhibitorski učinak akarboze na α -amilazu

Za koncentracije uzoraka akarboze navedene u tablici izmjerene su apsorbancije. Izmjerene apsorbancije korigirane su apsorbancijama slijepih proba, te je po formuli navedenoj u poglavlju metode izračunata aktivnost enzima α -amilaze (%).

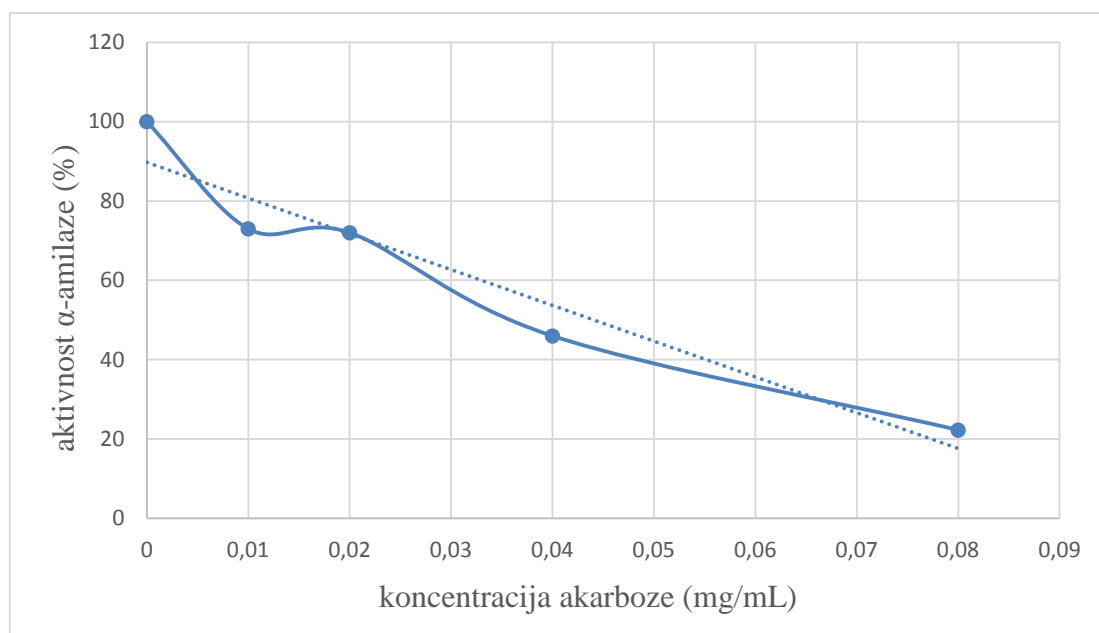
Tablica 7. Koncentrationski niz otopina akarboze s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancije, korigiranim apsorbancijama i aktivnosti α -amilaze

γ (mg/mL)	A _{540nm} SP_1	A _{540nm} SP_2	A _{540nm} SP_3	A _{540nm} UZ_1	A _{540nm} UZ_2	A _{540nm} UZ_3
0.08	0.0175	0.0170	0.0166	0.0403	0.0388	0.0396
0.04	0.0214	0.0200	0.0206	0.0672	0.0668	0.0676
0.02	0.0197	0.0182	0.0184	0.0897	0.0913	0.0939
0.01	0.0145	0.0145	0.0145	0.0894	0.0882	0.0875
0	0.0206	0.0225	0.0224	0.1245	0.1224	0.1222

γ (mg/mL)	avgSP	stdevSP	RSDSP	avgUZ	stdevUZ	RSDUZ	ΔA_{540nm}	%
0.08	0.0170	0.0005	2.6	0.0396	0.0008	1.9	0.0225	22
0.04	0.0207	0.0007	3.4	0.0672	0.0004	0.6	0.0465	46
0.02	0.0188	0.0008	4.3	0.0916	0.0021	2.3	0.0729	72
0.01	0.0145	0.0000	0.0	0.0884	0.0010	1.1	0.0739	73
0	0.0218	0.0011	4.9	0.1230	0.0013	1.0	0.1012	100

γ - koncentracija akarboze; A_{540 nm} SP- izmjerena apsorbancija slijepe probe; A_{540 nm} UZ- izmjerena apsorbancija uzorka akarboze; avg- srednja vrijednost apsorbancije; stdev – standardna devijacija; RSD – relativna standardna devijacija; ΔA_{540nm} - apsorbancija uzorka korigirana slijepom probom; %- aktivnost enzima α -amilaze

Na temelju dobivenih i izračunatih podataka, izrađen je grafički prikaz ovisnosti postotka aktivnosti enzima o koncentraciji akarboze koja je već utvrđeni inhibitor α -amilaze.



Slika 7. Ovisnost % aktivnosti α -amilaze o koncentraciji akarboze

Dobivene točke daju pravac jednadžbe $y = -901,68x + 89,699$, sa R^2 vrijednošću 0,9297.

Na temelju dobivenog grafa, vidimo da aktivnost enzima pada s porastom koncentracije akarboze, tj. inhibicija je sve veća. Dobivena ovisnost ima trend linearnosti. S većom koncentracijom inhibitora, izmjerene apsorbancije su sve manje, što je dokaz prisutnosti sve manje količine oslobođene maltoze u otopini.

Akarboza se reverzibilno veže na α -amilazu. U kliničkim ispitivanjima, lijek je pokazao iznimno lošu bioraspoloživost- apsorbira se manje od 2% oralno primjenjene doze. Kod višestruko primjenjenih doza, nije pokazano da dolazi do akumulacije lijeka u organizmu (www.drugbank.ca). U sljedećem potpoglavlju izračunata je i prikazana je IC_{50} vrijednost akarboze i daljnja rasprava u usporedbi s ispitivanim potencijalnim inhibitorima.

4.4 Inhibitorni učinak ekstrakata komine masline na α -amilazu

Za koncentracije uzoraka komine inkapsulirane HPB-om navedene u tablici 8. izmjerene su apsorbancije. Izmjerene apsorbancije korigirane su apsorbancijama slijepih proba, te je po formuli navedenoj u poglavlju metode izračunata aktivnost enzima α -amilaze (%).

Tablica 8. Koncentracijski niz uzoraka komine inkapsuliranog HPB-om, pripadajuće izmjerene vrijednosti apsorbancija, korigirane apsorbancije i aktivnost α -amilaze

γ (mg/mL)	A _{540nm} SP_1	A _{540nm} SP_2	A _{540nm} SP_3	A _{540nm} H_1	A _{540nm} H_2	A _{540nm} H_3
25.000	0.2936	0.2972	0.3009	0.3208	0.3233	0.3265
12.500	0.1753	0.1762	0.1908	0.2581	0.2641	0.2649
6.250	0.1057	0.1058	0.1076	0.2108	0.2152	0.2176
3.125	0.0714	0.0620	0.0759	0.1848	0.1860	0.1869
0	0.0152	0.0152	0.0152	0.1328	0.1329	0.1331

γ (mg/mL)	avgSP	stdevSP	RSDSP	avgH	stdevH	RSDH	ΔA_{540nm}	%
25.000	0.2972	0.0037	1.2	0.3235	0.0029	0.9	0.0263	22
12.500	0.1808	0.0087	4.8	0.2624	0.0037	1.4	0.0816	69
6.250	0.1064	0.0011	1.0	0.2145	0.0034	1.6	0.1082	92
3.125	0.0737	0.0032	4.3	0.1859	0.0011	0.6	0.1123	95
0	0.0152	0.0000	0.0	0.1329	0.0002	0.1	0.1177	100

γ - koncentracija uzorka komine inkapsuliranog HPB-om; A_{540 nm} SP- izmjerena apsorbancija slijepe probe; A_{540 nm} H- izmjerena apsorbancija uzorka; avg- srednja vrijednost apsorbancije; stdev – standardna devijacija; RSD – relativna standardna devijacija; ΔA_{540nm} - apsorbancija uzorka korigirana slijepom probom; %- aktivnost enzima α -amilaze

Za koncentracije uzoraka komine inkapsulirane RAMEB-om navedene u tablici 9. izmjerene su apsorbancije. Izmjerene apsorbancije korigirane su apsorbancijama slijepih proba, te je po formuli navedenoj u poglavlju metode izračunata aktivnost enzima α -amilaze (%).

Tablica 9. Koncentracijski niz uzoraka komine inkapsuliranog RAMEB-om, pripadajuće izmjerene vrijednosti apsorbancija, korigirane apsorbancije i aktivnost α -amilaze

γ (mg/mL)	A _{540nm} SP_1	A _{540nm} SP_2	A _{540nm} SP_3	A _{540nm} R_1	A _{540nm} R_2	A _{540nm} R_3
25.000	0.3027	0.3063	0.3083	0.3198	0.3212	0.3221
12.500	0.2021	0.2051	0.2062	0.2626	0.2642	0.2648
6.250	0.1222	0.1245	0.1282	0.2226	0.2230	0.2234
3.125	0.0773	0.0880	0.0806	0.1867	0.1870	0.1874
0	0.0152	0.0152	0.0152	0.1328	0.1329	0.1331

γ (mg/mL)	avgSP	stdevSP	RSDSP	avgUZ	stdevUZ	RSDUZ	ΔA_{540nm}	%
25.000	0.3058	0.0028	0.9	0.3210	0.0012	0.4	0.0153	13
12.500	0.2045	0.0021	1.0	0.2639	0.0011	0.4	0.0594	50
6.250	0.1250	0.0030	2.4	0.2230	0.0004	0.2	0.0980	83
3.125	0.0820	0.0055	6.7	0.1870	0.0004	0.2	0.1051	89
0	0.0152	0.0000	0.0	0.1329	0.0002	0.1	0.1177	100

γ - koncentracija uzorka komine inkapsuliranog RAMEB-om; A_{540 nm} SP– izmjerena apsorbancija slijepe probe; A_{540 nm} R- izmjerena apsorbancija uzorka; avg- srednja vrijednost apsorbancije; stdev– standardna devijacija; RSD– relativna standardna devijacija; ΔA_{540nm} - apsorbancija uzorka korigirana slijepom probom; %- aktivnost enzima α -amilaze

Za koncentracije nativnog uzorka komine navedene u tablici 10. izmjerene su apsorbancije. Izmjerene apsorbancije korigirane su apsorbancijama slijepih proba, te je po formuli navedenoj u poglavlju metode izračunata aktivnost enzima α -amilaze (%).

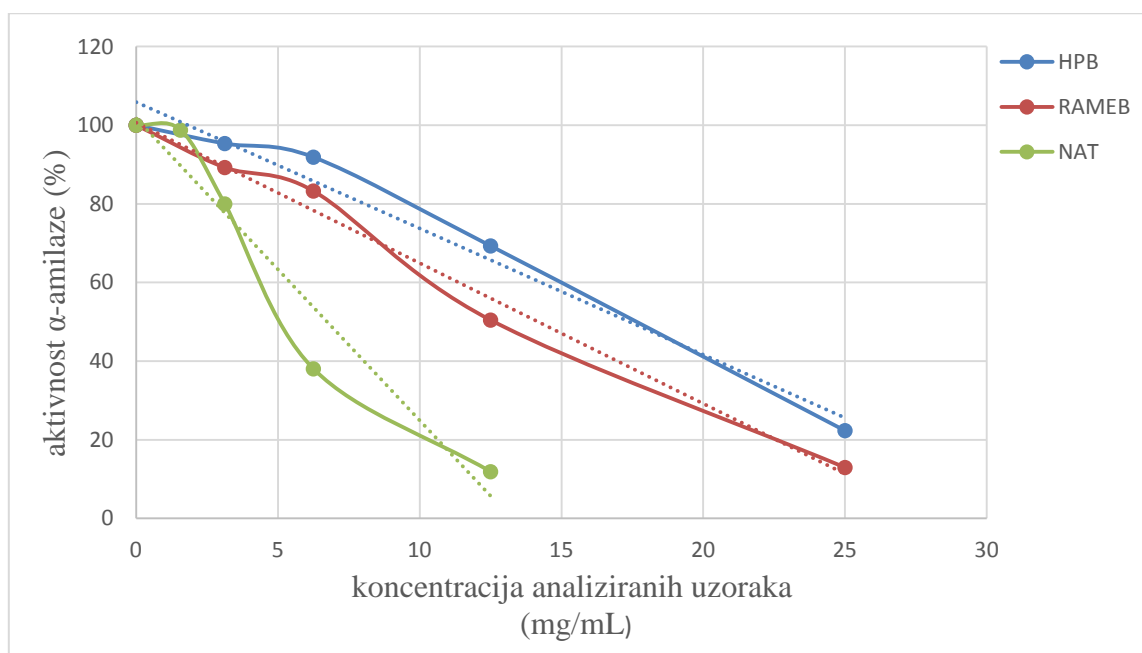
Tablica 10. Koncentracijski niz nativnog uzorka komine, pripadajuće izmjerene vrijednosti apsorbancija, korigirane apsorbancije i aktivnost α -amilaze

γ (mg/mL)	A _{540nm} SP_1	A _{540nm} SP_2	A _{540nm} SP_3	A _{540nm} N_1	A _{540nm} N_2	A _{540nm} N_3
12.5000	0.3439	0.3463	0.3504	0.3595	0.3608	0.3623
6.2500	0.2590	0.2631	0.2641	0.3049	0.3069	0.3088
3.1250	0.1511	0.1549	0.1570	0.2458	0.2489	0.2508
1.5625	0.0891	0.0902	0.0910	0.2004	0.2080	0.2107
0	0.0152	0.0152	0.0152	0.1328	0.1329	0.1331

γ (mg/mL)	avgSP	stdevSP	RSDSP	avgUZ	stdevUZ	RSDUZ	ΔA_{540nm}	%
12,5000	0.3469	0.0033	0.9	0.3609	0.0014	0.4	0.0140	12
6,2500	0.2621	0.0027	1.0	0.3069	0.0020	0.6	0.0448	38
3,1250	0.1543	0.0030	1.9	0.2485	0.0025	1.0	0.0942	80
1,5625	0.0901	0.0010	1.1	0.2064	0.0053	2.6	0.1163	99
0	0.0152	0.0000	0.0	0.1329	0.0002	0.1	0.1177	100

γ - koncentracija nativnog uzorka komine masline; $A_{540\text{ nm}}$ SP– izmjerena apsorbancija slijepe probe; $A_{540\text{ nm}}$ N- izmjerena apsorbancija uzorka; avg- srednja vrijednost apsorbancije; stdev– standardna devijacija; RSD– relativna standardna devijacija; ΔA_{540nm} - apsorbancija uzorka korigirana slijepom probom; %- aktivnost enzima α -amilaze

Na temelju svih dobivenih i izračunatih podataka, slijedi izrađeni grafički prikaz ovisnosti postotka aktivnosti enzima o koncentraciji sva 3 uzorka koji su potencijalni ispitivani inhibitori.



Slika 8. Ovisnost aktivnosti α -amilaze o koncentraciji analiziranih uzoraka

Dobivene točke za HPB daju pravac jednadžbe $y = -3.215x + 105.89$, sa R^2 vrijednošću 0.977, za RAMEB $y = -3.5717x + 100.67$, sa R^2 vrijednošću 0.9391, te za nativni uzorak $y = -7.6797x + 101.73$, sa R^2 vrijednošću 0.9391.

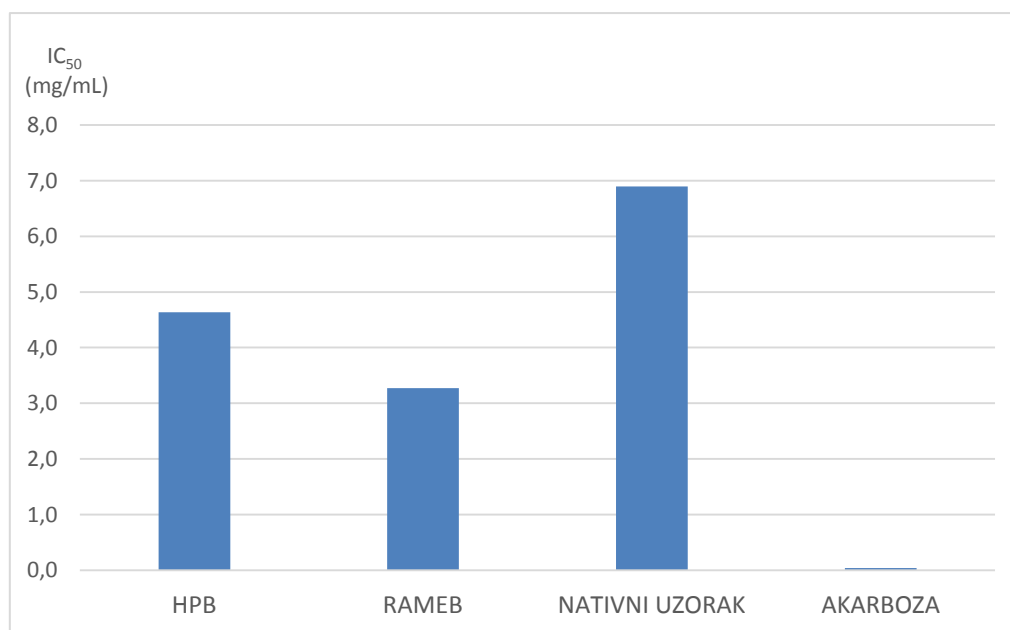
Za sva 3 uzorka, s porastom njihove koncentracije, aktivnost α -amilaze pada, tj. inhibitorski učinak je veći. Uzorci HPB i RAMEB pokazuju bolju linearnu ovisnost u usporedbi s nativnim uzorkom. Da bismo utvrdili točni inhibitorski potencijal, potrebno je odrediti IC_{50}

vrijednost, tj. koncentraciju inhibitora koja je potrebna da aktivnost enzima padne na 50%. Navedenu vrijednost dobivamo iz priloženog grafičkog prikaza ovisnosti postotka (%) aktivnosti enzima o koncentraciji uzorka, tj. njihovih jednadžbi, uvrštavanjem vrijednosti 50 pod y.

U tablici 11. navedene su dobivene IC_{50} vrijednosti za svaki uzorak, uključujući i akarbozu. Kod uzoraka inkapsuliranih sa HPB-om i RAMEB-om bitno je preračunati jer udio komine nije 100% kao u nativnom uzorku. Obzirom da je udio komine u uzorku HPB 26%, a u uzorku RAMEB 23%, konačne IC_{50} vrijednosti su niže.

Tablica 11. IC_{50} vrijednosti analiziranih uzoraka (i preračunate s obzirom na udio komine)

uzorak	IC_{50} (mg/mL)	udio komine u uzorku	IC_{50} komine (mg/mL)
HPB	17.40	0.26	4.5
RAMEB	14.20	0.23	3.2
Nativni	6.70	1.00	6.7
Akarboza	0.04	/	/



Slika 9. Usporedni prikaz IC_{50} vrijednosti komine inkapsulirane HPB-om, RAMEB-om, nativnog uzorka komine i akarboze

Navedeni rezultati IC_{50} vrijednosti prikazani su grafički na slici 9. Iz navedenog prikaza jasnije uviđamo omjer koncentracija potrebnih za inhibiciju enzima. Koncentracija akarboze

potrebna za 50 %-tnu inhibiciju iznosi 0.04 mg/mL, a u slučaju nativnog uzorka komine masline to iznosi 6.7 mg/mL, što je 167.5 puta veća koncentracija.

Uzorci inkapsulirani ciklodesktrinima daju pogodnije rezultate. Komina inkapsulirana HPB-om daje vrijednost IC_{50} od 4.5 mg/mL, što je u usporedbi s akarbozom 112.5 puta veća koncentracija, a RAMEB-om 3.2 mg/mL, što je 80 puta veća koncentracija od akarboze.

Do sada je već ispitan inhibitorni učinak nekoliko biljnih vrsta na α -amilazu. Kao primjer za detaljniju usporedbu dobivenih rezultata uzet je inhibitorni učinak *Teucrium* vrste, konkretnije *T. Polium*, *T. Oliverianum* i *T. Orientale* (Dastjerdi i sur., 2015). Provedeno je istraživanje u kojem su ekstrakti svih triju biljaka pripremljeni u različitim otapalima- DCMC (dichloromethane), EAC (ethyl acetate) i HAC (hydroalcoholic). Za svaki ekstrakt napravljena su serijska dvostruka razrjeđenja, tako da su dobivene koncentracije koje su bile istovjetne našima (25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 mg/mL). Korištena je istovjetna metoda.

Sveukupno najbolji rezultat dao je HAC ekstrakt vrste *T. polium*- IC_{50} vrijednost 1.64 mg/mL. HAC ekstrakt *T. Oliverianum* dao je IC_{50} vrijednost 3.86 mg/mL. Kod *T. Orientale*, najboljim se pokazao EAC ekstrakt, IC_{50} 8.55 mg/mL. Sveukupno najlošiji rezultat dao je DCMC ekstrakt *T. Orientale*- IC_{50} 22.59 mg/mL. Kao pozitivna kontrola također je korištena akarboza, a izmjerena vrijednost IC_{50} za nju iznosila je 0.037 mg/mL.

U usporedbi, naši dobiveni rezultati slični su i jednako dobri.

Naša dobivena IC_{50} vrijednost za akarbozu iznosi 0.04 mg/mL, što je u usporedbi sa 0.037 mg/mL minimalna razlika i potvrda točnosti s obzirom da se radi o drugom laboratoriju i vjerojatno nekim drugačijim uvjetima rada.

Naš najbolji rezultat postignut je za ekstrakt komine inkapsuliran RAMEB-om, IC_{50} 3.2 mg/mL. Taj rezultat je najbliži njihovom drugom najboljem, 3.01 mg/mL za DCMC ekstrakt *T. Polium*. Naša vrijednost od 4.5 mg/mL za HPB, najbližija je njihovoj 4.31 mg/mL za EAC ekstrakt *T. Oliverianum*.

Ispitivanje istom metodom provedeno je i na biljnoj vrsti *Adenantha pavonina*, točnije ekstraktu dobivenom iz listova. Dobivena IC_{50} vrijednost za metanolni ekstrakt iznosila je 16.16 μ g/mL, što je pokazatelj izvrsnog inhibitornog potencijala ove biljke na α -amilazu (Nirmali Wickramaratne i sur., 2016). Nadalje, u jednom drugom istraživanju izvrsne rezultate

dao je i ekstrakt zelene alge *Chaetomorpha aerea*, IC₅₀ 408.9 µg/mL (Unnikrishnan i sur., 2015).

Sumarno, naši dobiveni rezultati inhibicije za nativni ekstrakt komine pokazali su se dobrima, ali puno bolju inhibiciju ostvarili su ekstrakti inkapsulirani korištenim ciklodestrinima. Ciklodestrini su farmaceutski ekscipijensi koji imaju temeljno svojstvo da stvaraju inkluzijske komplekse, a time među ostalim mogu povećati bioraspoloživost lijeka neovisno o putu primjene. Zahvaljujući biokompatibilnosti i netoksičnosti, ciklodekstrini se mogu koristiti u ljekovitim oblicima namijenjenim za različite putove primjene, uključujući oralni, okularni, nazalni te parenteralni put (Jug i Bećirević-Laćan, 2008). Ovim radom također je pokazan značaj uporabe ciklodekstrina u izuzetnom poboljšanju postignute inhibicije α -amilaze. Izvrsnim se pokazao RAMEB. Korišteni ciklodekstrini vjerojatno stvaraju inkluzijske komplekse sa molekulama odgovornim za inhibitorni učinak, te ih štite u procesu ekstrakcije i sušenja. Ovi rezultati ostavljaju prostora za daljnja istraživanja poboljšanja iskoristivosti nativnog uzorka komine masline.

Iz dobivenih rezultata nedvojbeno se utvrđuje *in vitro* inhibitorna aktivnost ekstrakta komine masline na α -amilazu. To djelovanje vjerojatno se postiže polifenolnim spojevima koji su prisutni u komini. Navedeno znači da bi ekstrakt komine mogao u ljudskom organizmu usporiti razgradnju složenih ugljikohidrata, i time regulirati postprandijalnu glikemiju kod pacijenata oboljelih od šećerne bolesti tipa 2. S obzirom na koncentracije potrebne za ostvarenje inhibitornog učinka, primjena tih bioaktivnih komponenata bila bi osobito korisna kao sastavni dio dijetoterapije pacijenata sa preddijabetesom.

Naravno, potrebna su daljnja *in vitro* te potom *in vivo* istraživanja da se potvrde dobivena zapažanja. Za početak, potrebno bi bilo izolirati aktivne kemijske spojeve koji postižu ovo djelovanje. U svakom slučaju, rezultati ovog istraživanja pozitivni su i moguć je njihov doprinos daljnjim istraživanjima novih potencijalnih antidijabetika izoliranih iz biljnih ekstrakata, koji bi u eventualnoj uporabi mogli imati manje nuspojava od postojećih lijekova, npr. akarboze. No, i to je jedan od mogućih predmeta istraživanja.

5. Zaključak

- ❖ Ekstrakti komine masline inhibiraju aktivnost α -amilaze
- ❖ Nativni ekstrakt komine masline postiže 50%-tnu inhibiciju enzima u koncentraciji od 6.7 mg/mL
- ❖ Ekstrakt komine masline inkapsuliran HPB-om postiže 50%-tnu inhibiciju enzima u koncentraciji od 4.5 mg/mL
- ❖ Ekstrakt komine masline inkapsuliran RAMEB-om postiže 50%-tnu inhibiciju enzima u koncentraciji od 3.2 mg/mL
- ❖ Inkapsulacijom ciklodekstrinima postiže se poboljšanje inhibitornog učinka ekstrakata komine masline, vjerojatno zbog zaštite aktivnih sastavnica prisutnih u ekstraktu
- ❖ Dobiveni rezultati ostavljaju prostora za daljnja istraživanja i izolaciju bioaktivnih spojeva (polifenola) koji postižu antidijabetički učinak i koji bi kao sastavni dio dijetoterapije ili kao biljni lijekovi mogli doprinjeti suzbijanju simptoma šećerne bolesti tipa 2.

6. Literatura

- 1) Acarbose identification, 2018, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00284>, pristupljeno 10.9.2018.
- 2) Acarbose tablet, 2015, <https://dailymed.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 22.8.2018.
- 3) Action of alpha amylase on starch, 2014, <https://usmle.biochemistryformedics.com/action-of-alpha-amylase-on-starch/>, pristupljeno 20.8.2018.
- 4) Acquaviv R, Lauk L. Natural polyphenols as anti-inflammatory agents. *Front in Biosc*, 2010, S2, 318-331.
- 5) Bachmann K. Drug–Drug Interactions with an Emphasis on Drug Metabolism and Transport. U: *Pharmacology, principles and practice*, 2009, str. 303-325.
- 6) Bertoft E. Understanding starch structure: recent progress, 2017, <https://www.mdpi.com/journal/agronomy>, pristupljeno 17.8.2018.
- 7) Brlek-Savić T, Voća N, Krička T, Jurišić V. Komina masline kao izvor energije. *Glas za št bilja*, 2009, 3, 13-15.
- 8) Dastjerdi ZM, Namjoyan F, Azemi ME. Alpha amylase inhibition activity of some plants extract of Teucrium species. *Europ Jour of Biol Scienc*, 2015, 7(1), 26-31.
- 9) Dijabetes, 2017, <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-koordinaciju-i-provođenje-programa-i-projekata-za-prevenciju-kronicnih-nezaraznih-bolest/dijabetes/>, pristupljeno 24.7.2018.
- 10) Enzymatic Assay of α -Amylase (EC 3.2.1.1), Sigma-Aldrich, 2018, <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.printerview.html>, pristupljeno 15.6.2018.
- 11) Fabiani R, Rosignoli P, de Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr*, 2008, 138, 1411–1416.
- 12) IDF diabetes atlas, 2017, <http://www.diabetesatlas.org/>, pristupljeno 7.9.2018.
- 13) Jug M, Bećirević-Laćan M. Cyclodextrin-based pharmaceuticals, *Rad Med Scienc*, 2008, 9-26.
- 14) Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Hormoni gušterače i lijekovi za liječenje šećerne bolesti. U: *Temeljna i klinička farmakologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2011, str. 727-745.

- 15) Kujundžić M. i suradnici. Endokrina gušterača i gastrointestinalni hormoni. U: Klinička patofiziologija za studente Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta, Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2003, str. 285-291.
- 16) Kuštrak D. Masti, masna ulja i voskovi. U: Farmakognozija-Fitofarmacija, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2005, str. 192-193.
- 17) Malt-chemistry of malting, 2003, <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/alpha-amylase>, pristupljeno 27.7.2018.
- 18) Nirmali Wickramaratne M, Punchihewa JC, Wickramaratne DBM. In vitro alpha-amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenanthera pavonina*. *BMC complem altern med*, 2016, 16, 466.
- 19) Rahelić D, Altabas V, Bakula M, Krznarić Ž. i suradnici. Hrvatske smjernice za farmakološko liječenje šećerne bolesti tipa 2, *Liječ Vjesn*, godište 138, 2016.
- 20) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Endokrina gušterača i kontrola glukoze u krvi. U: Farmakologija, Golden marketing- Tehnička knjiga, Zagreb, 2005, str. 385-392.
- 21) Rigacci S, Stefani M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *Intern Jour of Molec Scien*, 2016, 17(6), 843.
- 22) Singla RK, Singh R, Dubey AK. Important aspects of post- prandial antidiabetic drug acarbose. *Curr Top in Medic Chem*, 2016, 16, 1-9.
- 23) Starch- chemical compound, 2018, <https://www.britannica.com/science/starch>, pristupljeno 24.8.2018.
- 24) Taralas G, Kontominas MG. Pyrolysis of solid residues commencing from the olive oil food industry for potential hydrogen production. *Jour of analit and appl Pyrol*, 2006, 76, 109.
- 25) Tundis R, Loizzo M, Menichini F, Statti G, Menichini F. Biological and pharmacological activities of iridoids: Recent developments. *Mini Rev Med Chem*, 2008, 8, 399–420.
- 26) Unnikrishnan PS, Suthindhiran K, Jayasri MA. Alpha-amylase inhibition and antioxidant activity of marine green algae and its possible role in diabetes management. *Pharmacoqn Mag*, 2015, 11, 511-515.

7. Sažetak / Summary

7.1 Sažetak

Dijabetes mellitus je metabolički poremećaj kompleksne etiologije okarakteriziran stanjem kronične hiperglikemije s poremećajem metabolizma ugljikohidrata, masti i proteina, što je rezultat nedostatka izlučivanja inzulina i/ili djelovanja inzulina na razini stanice. Jedan od načina regulacije postprandijalne glikemije je usporavanje razgradnje i apsorpcije ugljikohidrata unesenih prehranom, djelovanjem na enzim α -amilazu. Taj način liječenja trenutno je moguć akarbozom koja je inhibitor α -amilaze. U posljednje vrijeme proučavaju se potencijalni novi antidijabetici, bioaktivni spojevi izolirani iz biljaka. Primjena bioaktivnih komponenata sa antidijabetičkim učinkom bila bi osobito korisna kao sastavni dio dijetoterapije pacijenata sa preddijabetesom. Komina masline je čvrsti nusprodukt koji nastaje u proizvodnji maslinovog ulja, i sadrži polifenolne spojeve. U ovom radu ispitan je mogući inhibitorni učinak ekstrakata komine masline na aktivnost α -amilaze. U svrhu dodatnog poboljšanja učinkovitosti nativnog ekstrakta, pripremljeni su i istraženi uzorci inkapsulirani ciklodekstrinima. Sva tri korištena uzorka- nativni, HPB i RAMEB pokazali su inhibitorni učinak na α -amilazu. IC_{50} vrijednosti redom su iznosile 6.7, 4.5, i 3.2 mg/mL (akarboza 0.04 mg/mL). Ovim istraživanjem pokazano je da ekstrakt komine masline ostvaruje inhibitorni učinak na α -amilazu, tim bolji ako je uklopljen u ciklodekstrine. Ovi bi rezultati mogli poslužiti za daljnja istraživanja, prije svega potvrde i izolaciju spojeva koji su odgovorni za inhibitorni učinak, a potom i razvoj potencijalnih antidijabetika dobivenih iz ekstrakata komine masline.

7.2 Summary

Diabetes mellitus is a metabolic disease of complex etiology characterized by chronic hyperglycemia with disorder of carbohydrate, fat and protein metabolism resulting from defects in either insulin secretion or insulin action, or both. One approach for decreasing postprandial hyperglycemia is slowing down degradation and absorption of dietary carbohydrates, acting upon α -amylase. This approach for treating the disease is currently possible with acarbose which is well known α -amylase inhibitor. Recently, several researches have been investigating potential new anti-diabetic substances, which are bioactive compounds isolated from plants extracts. Use of these bioactive compounds with anti-diabetic activity would be particularly useful as part of nutrition therapy for patients with pre-diabetes. Olive pomace is a solid by-product resulting from olive oil production, and it is rich source of polyphenols. In this study, possible inhibitory effect of olive pomace extract on α -amylase activity has been investigated. All analyzed samples - native, HPB and RAMEB have shown inhibitory effect on α -amylase. Calculated IC_{50} values were 6.7, 4.5 and 3.2 mg/mL respectively (acarbose 0.04 mg/mL). This study proved that olive pomace extracts exhibited considerable α -amylase inhibition activity, which was additionally improved by cyclodextrin encapsulation. Obtained results could be used for further studies, firstly for investigation of active compounds responsible for observed activity, and subsequent development of novel anti-diabetics isolated from olive pomace extracts.

8. Temeljna dokumentacijska kartica **/ Basic documentation card**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Kemiju prehrane
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj ekstrakta komine masline na aktivnost α -amilaze

Mateja Košutić

SAŽETAK

Dijabetes mellitus je metabolički poremećaj kompleksne etiologije okarakteriziran stanjem kronične hiperglikemije s poremećajem metabolizma ugljikohidrata, masti i proteina, što je rezultat nedostatka izlučivanja inzulina i/ili djelovanja inzulina na razini stanice. Jedan od načina regulacije postprandijalne glikemije je usporavanje razgradnje i apsorpcije ugljikohidrata unesenih prehranom, djelovanjem na enzim α -amilazu. Taj način liječenja trenutno je moguć akarbozom koja je inhibitor α -amilaze. U posljednje vrijeme proučavaju se potencijalni novi antidijabetici, bioaktivni spojevi izolirani iz biljaka. Primjena bioaktivnih komponenata sa antidijabetičkim učinkom bila bi osobito korisna kao sastavni dio dijetoterapije pacijenata sa preddijabetesom. Komina masline je čvrsti nusprodukt koji nastaje u proizvodnji maslinovog ulja, i sadrži polifenolne spojeve. U ovom radu ispitan je mogući inhibitorski učinak ekstrakata komine masline na aktivnost α -amilaze. U svrhu dodatnog poboljšanja učinkovitosti nativnog ekstrakta, pripremljeni su i istraženi uzorci inkapsulirani ciklodekstrinima. Sva tri korištena uzorka- nativni, HPB i RAMEB pokazali su inhibitorski učinak na α -amilazu. IC_{50} vrijednosti redom su iznosile 6.7, 4.5, i 3.2 mg/mL (akarboza 0.04 mg/mL). Ovim istraživanjem pokazano je da ekstrakt komine masline ostvaruje inhibitorski učinak na α -amilazu, tim bolji ako je uklopljen u ciklodekstrine. Ovi bi rezultati mogli poslužiti za daljnja istraživanja, prije svega potvrde i izolaciju spojeva koji su odgovorni za inhibitorski učinak, a potom i razvoj potencijalnih antidijabetika dobivenih iz ekstrakata komine masline.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 44 stranice, 9 grafičkih prikaza, 11 tablica i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Komina, α -amilaza, ciklodekstrini, šećerna bolest tipa 2

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr.sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ivan Pepić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lovorka Vujić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Food Chemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Olive pomace extract effects on α -amylase activity

Mateja Košutić

SUMMARY

Diabetes mellitus is a metabolic disease of complex etiology characterized by chronic hyperglycemia with disorder of carbohydrate, fat and protein metabolism resulting from defects in either insulin secretion or insulin action, or both. One approach for decreasing postprandial hyperglycemia is slowing down degradation and absorption of dietary carbohydrates, acting upon α -amylase. This approach for treating the disease is currently possible with acarbose which is well known α -amylase inhibitor. Recently, several researches have been investigating potential new anti-diabetic substances, which are bioactive compounds isolated from plants extracts. Use of these bioactive compounds with anti-diabetic activity would be particularly useful as part of nutrition therapy for patients with pre-diabetes. Olive pomace is a solid by-product resulting from olive oil production, and it is rich source of polyphenols. In this study, possible inhibitory effect of olive pomace extract on α -amylase activity has been investigated. All analyzed samples - native, HPB and RAMEB have shown inhibitory effect on α -amylase. Calculated IC_{50} values were 6.7, 4.5 and 3.2 mg/mL respectively (acarbose 0.04 mg/mL). This study proved that olive pomace extracts exhibited considerable α -amylase inhibitory activity, which was additionally improved by cyclodextrin encapsulation. Obtained results could be used for further studies, firstly for investigation of active compounds responsible for observed activity, and subsequent development of novel anti-diabetics isolated from olive pomace extracts.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 44 pages, 9 figures, 11 tables and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pomace, α -amylase, cyclodextrins, diabetes mellitus type 2

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.

